

氏 名	よしおか しずえ 吉 岡 志 津 枝
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	甲第518号
学位授与年月日	平成17年 3月11日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学 位 論 文 題 目	The PI3K-Akt pathway in SN-38-induced apoptosis in human gastric cancer cell lines (ヒト胃癌細胞株における SN-38 誘導アポトーシスに対する PI3K-Akt 経路)
学位論文審査委員	(主査) 井 藤 久 雄 (副査) 村 脇 義 和 池 口 正 英

学 位 論 文 の 内 容 の 要 旨

塩酸イリノテカン[®]はカンプトテシンから合成され、トポイソメラーゼⅠを阻害することにより DNA 合成を抑制し、抗腫瘍活性を示す癌化学療法剤である。生体内で 100 倍以上の活性を有する SN-38 に代謝され、癌細胞のアポトーシスを誘導する。一方、細胞にはアポトーシス抑制性および cell survival 促進性に作動するシグナル伝達系が存在し、PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase)-Akt 経路がその一つとして知られている。また、PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) は PI3K の産生した PI (3, 4, 5) P₃ の 3 位リン酸基を特異的に脱リン酸化し、PI3K の作用と拮抗する癌抑制タンパクである。

本研究では、胃癌培養細胞株に対する SN-38 誘導アポトーシスと PI3K-Akt 経路の関連について検討した。

方 法

ヒト胃癌細胞株 MKN1、MKN28、MKN45、MKN74、KATO-III を用い、SN-38 に対する感受性を XTT assay で求めた。SN-38 高感受性を示した 3 細胞株のうち MKN45、低感受性を示した 2 細胞株のうち MKN1 を研究に用いた。

フローサイトメトリーにより細胞周期の変化を検討した。また、ヘキスト染色による形態学的観察にてアポトーシス細胞を判定し、ウエスタンブロット法により、phospho-Akt (pAkt)、PTEN の発現の変化を観察した。さらに、SN-38 抵抗性を示した細胞株に対し PI3K 阻害剤である LY294002 を用い、pAkt 発現を阻害し、SN-38 抵抗性と pAkt 発現の関係を検討した。

結 果

XTT assay にて SN-38 に対する MKN1、MKN45 の ID₅₀ はそれぞれ 250nM、20nM であり、10 倍程度の差がみられた。細胞周期の解析から、MKN1 は SN-38、20nM 処理では G2/M 期集積を、250nM 処理では S 期を示す細胞が増加し、sub-G1 フラクシオンは 13.5% であった。MKN45 は 20nM 処理で G2/M に集積傾向を示し、250nM では sub-G1 フラクシオンが 36.8% であり、形態学的には多数のアポトーシス細胞が見い出された。pAkt 発現をウエスタンブロット法で検討すると、MKN45 では SN-38 濃度依存性に低下したのに対して、MKN1 では不変であった。また、PTEN 発現は両細胞株で変化が見られなかった。

pAkt 発現の相違が SN-38 抵抗性に関連するかどうか検索する目的で、MKN1 において PI3K 阻害剤である LY294002 を SN-38 投与 1 時間前に処理した。これにより、MKN1 の pAkt 発現は SN-38 濃度依存性に減少したが PTEN 発現に影響を与えなかった。S 期細胞は減少し、sub-G1 フラクシオンは 35.9% に上昇し、形態学的にもアポトーシス細胞が増加した。

考 察

SN-38 は I 型トポイソメラーゼを阻害することにより DNA 合成を阻害して抗腫瘍活性を示し、細胞周期の S 期（DNA 合成期）の細胞に対して特異的に殺細胞効果を示す。SN-38 は濃度依存的に G2/M 期を経て S 期へ細胞を誘導することが報告されているが、本研究でも MKN1 細胞は SN-38 処理により G2/M 期から S 期へと誘導されていた。他方、MKN45 は 20nM では顕著ではないが G2/M 期や S 期への集積傾向が見い出された。

PI3K-Akt 経路は生のシグナル伝達や、アポトーシス抑制性効果に関与する経路である。PI3K によりリン酸化された Akt は Bad、Caspase9 などをリン酸化し不活性化することでアポトーシスを抑制する。また、PTEN は PI3K の産物を脱リン酸化することでアポトーシス促進性に作用することが知られている。肺癌細胞株において Akt の過剰発現は topotecan によるアポトーシス誘導を阻害することが報告されている。胃癌細胞株における SN-38 によるアポトーシス誘導抵抗性と PI3K-Akt 経路の関連はこれまでに検討されていない。本研究では SN-38 により pAkt 発現が抑制されることにより MKN45 はアポトーシスが誘導されることを示したが、抑制されなかった MKN1 は S 期に停止するのではないかと考えられた。この際、PTEN 発現に変化はなく、他の経路で pAkt 発現が制御されていることが予想された。さらに、PI3K 阻害剤による pAkt 発現を抑制することにより、MKN1 細胞にアポトーシスが誘導され、SN-38 感受性増加に有効であることが示唆された。

結 語

トポイソメラーゼ I 阻害剤である SN-38 はヒト胃癌細胞株にアポトーシスあるいは細胞周期アレストを誘導するが、PI3K-Akt 経路が重要な役割を果たしているものと見なされた。

論文審査の結果の要旨

本研究ではヒト胃癌培養細胞株に対するトポイソメラーゼ I 阻害剤である SN-38 の効果を分子生物学的に解析している。MKN45 ではアポトーシスが、MKN1 では細胞周期の停止が生じ、その際、前者では pAkt の発現低下が示された。MKN1 では SN-38 処理前に PI3K 阻害剤である LY294002 を添加すると、効率的にアポトーシスが誘導されることを示した。なお、PTEN 発現は変化を認めていない。従って、SN-38 はヒト胃癌細胞株にアポトーシスあるいは細胞周期アレストを誘導するが、PI3K-Akt 経路が重要な役割を果たしているものと見なされる。かかる知見はヒト胃癌における新たな分子標的治療の可能性を示唆したものであり、明らかに学術の水準を高めたものと認められる。